

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭63-185996

⑬ Int. Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和63年(1988)8月1日

C 07 K 3/00  
A 61 K 39/29  
C 07 K 13/00

8318-4H

7252-4C

8318-4H※審査請求 未請求 発明の数 17 (全20頁)

⑮ 発明の名称 B型肝炎e抗原の製造法およびその材料

⑯ 特 願 昭62-322654

⑰ 出 願 昭62(1987)12月19日

優先権主張 ⑱ 1986年12月19日 ⑲ 米国(US) ⑳ 944,645

㉑ 発 明 者 フィリップ・アール・アメリカ合衆国イリノイ 60085、ウオケガン、ジレット  
アンデルセン ト・アベニュー 235番

㉒ 発 明 者 ラリー・テイ・ミム アメリカ合衆国イリノイ 60046、レイク・ビラ、ショー  
ス ショーニ・トレイル 8番

㉓ 発 明 者 イサ・ケイ・マツシア アメリカ合衆国イリノイ 60087、ウオケガン、アーサ  
ウオー ー・ドライブ 1923番

㉔ 出 願 人 アボット・ラボラトリ アメリカ合衆国イリノイ 60064、アボット・パーク(番  
ーズ 地の表示なし)

㉕ 代 理 人 弁理士 青 山 葆 外1名  
最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

B型肝炎e抗原の製造法およびその材料

2. 特許請求の範囲

(1) カオトロープで変性させすみやかに非変性バッファー中に希釈したときに、HBcAg免疫反応性は実質的になくなっているがHBsAg免疫反応性は保持している、HBcAg免疫反応性およびHBsAg免疫反応性を有するポリペプチドをコードする核酸配列からなるポリヌクレオチド。

(2) HBcAgをコードする配列の3'末端から120ヌクレオチドが欠けた核酸配列からなるものである特許請求の範囲第(1)項記載のポリヌクレオチド。

(3) 第8図に示すヌクレオチド配列を有するものである特許請求の範囲第(1)項記載のポリヌクレオチド。

(4) 該ポリペプチドが大腸菌発現産物である、特許請求の範囲第(1)項記載のポリヌクレオチドのポリペプチド発現産物。

(5) 第5図に示すヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドをBglⅡで消化した産物である特許請求の範囲第(1)項記載のポリヌクレオチド。

(6) 第5図に示すヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドをHaeⅢ、RsaⅠおよびHindⅢで消化した産物である特許請求の範囲第(1)項記載のポリヌクレオチド。

(7) 特許請求の範囲第(1)項、第(2)項、第(3)項、第(5)項または第(6)項記載のポリヌクレオチドのポリペプチド発現産物。

(8) (a) 特許請求の範囲第(1)項のポリヌクレオチドを発現してHBcAgおよびHBsAg免疫反応性を有するポリペプチドを得、

(b) 前記ポリペプチドをカオトロープ剤中で変性させ、ついで

(c) 前記変性された蛋白質を非変性剤中にすばやく希釈すること

を特徴とする、HBsAg免疫反応性は有しているがHBcAg免疫反応性に欠けたポリペプチドの製造方法。

(9) 特許請求の範囲第(8)項記載の方法で得られたポリペプチド。

(10) (a) 特許請求の範囲第(3)項記載のポリヌクレオチドを発現してHBcAgおよびHBsAg免疫反応性を有するポリペプチドを得、

(b) 前記ポリペプチドをカオトロブ剤中で変性させ、ついで

(c) 前記変性された蛋白質を非変性剤中にすばやく希釈すること  
を特徴とする、HBsAg免疫反応性は有しているがHBcAg免疫反応性に欠けたポリペプチドの製造方法。

(11) 特許請求の範囲第(10)項記載の方法で得られたポリペプチド。

(12) カオトロブ剤が塩酸グアナジンである特許請求の範囲第(8)項または第(10)項記載の方法。

(13) 非変性剤がヒト血漿である特許請求の範囲第(8)項または第(10)項記載の方法。

(14) 特許請求の範囲第(1)項記載のポリヌ

グループを検出することを特徴とする、試料中のHBsAgに対する抗体の検出方法。

(18) 特許請求の範囲第(9)項記載のポリペプチドでコーティングされた固体支持体を試料と接触させ、ついで前記固体支持体を、リポーターグループの結合した抗ヒト抗体と接触させ、固体支持体上に存在するリポーターグループを検出することを特徴とする、試料中のHBsAgに対する抗体の検出方法。

(19) 特許請求の範囲第(9)項記載のポリペプチドの有効量で動物を免疫させ、該動物の血清、血漿または他の体液から抗HBsAg抗体を単離することを特徴とする、特許請求の範囲第(9)項記載のポリペプチドに対するポリクローナル抗体の製造方法。

(20) 特許請求の範囲第(19)項記載の方法により製造されたポリクローナル抗体。

(21) 特許請求の範囲第(9)項記載のポリペプチドの有効量で動物を免疫させ、該動物からの抗体産生細胞をミエロマ細胞と融合させ、HB

クレオチドからなる、生物学的に機能のあるDNA嵌生物形質転換ベクター。

(15) 抗HBsAgでコーティングされた固体支持体を、試料および、特許請求の範囲第(9)項記載のポリペプチドからなる中和剤と接触させ、ついでリポーターグループの結合した抗HBsAgに前記固体支持体を接触させ、固体支持体上に存在するリポーターグループを検出することを特徴とする、試料中のHBsAgに対する抗体の検出方法。

(16) 特許請求の範囲第(9)項のポリペプチドでコーティングされた固体支持体に試料をさらし、ついでリポーターグループの結合した特許請求の範囲第(9)項記載のポリペプチドに前記固体支持体を接触させ、固体支持体上に存在するリポーターグループを検出することを特徴とする、試料中のHBsAgに対する抗体の検出方法。

(17) 特許請求の範囲第(9)項記載のポリペプチドでコーティングされた固体支持体を、試料および、リポーターグループの結合した抗HBsAgと接触させ、固体支持体上に存在するリポーター

Agに対するモノクローナル抗体を産生する培養中のハイブリドーマを単離し、培養から該モノクローナル抗体を精製単離することを特徴とする、特許請求の範囲第(9)項記載のポリペプチドに対するモノクローナルの製造方法。

(22) 特許請求の範囲第(21)項記載の方法により製造されたモノクローナル抗体。

(23) 薬学的に許容しうる希釈剤、アジュバントもしくは担体および特許請求の範囲第(9)項記載のポリペプチドからなるワクチン。

### 3. 発明の詳細な説明

#### [産業上の利用分野]

本発明は、一般に、組換えDNA法によるB型肝炎ウイルス抗原(以下、HBsAgという)製造のための方法および材料に関する。とりわけ、本発明は、HBsAg活性を有するポリペプチドをコードするDNAに由来するHBsAg、および組換えHBsAgの変性および希釈による適当なエピトープの精製および派生(derivation)に関する。

#### [従来技術]

B型肝炎ウイルス(以下、HBVという)は、以前は「血清肝炎」として知られ、今はB型肝炎として知られている病気を引き起こす。世界中でHBVのキャリアーは2億人に達すると推定されている。該ウイルスの感染は、急性および/または慢性的の肝臓病の主要な原因である。HBVウイルスのキャリアーは、肝萎縮硬変および肝臓癌の高い危険性がある。

HBVは、ヒト血清中ではデイン粒子として同定されている。デイン粒子は、直径が42nmであり、脂質、DNA、および少なくとも4種のタンパク質、すなわち、B型肝炎表面抗原(以下、HBsAgという)、B型肝炎コア抗原(以下、HBcAgという)、HBcAgおよびDNAポリメラーゼを含んでいる。

HBcAgはデイン粒子のコアの一部であり、主要な構成ポリペプチドであって、HBVに感染したヒトの血清中では上述の形態、または免疫グロブリンG(以下、IgGという)と結合して存在する[イマイら(Imai et al)、J. Immunol.,

患者の血清である。HBcAgを血清から精製することは困難である。その理由は、HBcAgは非常に低い濃度(<1ng/ml)で存在し、しかもそれ自身同士またはIgGもしくは血清アルブミンと凝集し、そのため、分子量および電荷に関して分子的に不均質になるからである[ヤマデら(Yamade et al)、J. Gen. Virol., 55巻、75~86(1981)]。

血清HBcAgの精製には一般にアフィニティークラムが用いられ、その場合、抗HBcをリガンドとして用い、その上にHBcAgを含有する血清を循環させる。ついでHBcAgを、高い塩または低いpHのような厳しい条件を用いて溶出させる。溶出されたHBcAgをゲル濾過に付す[イマイら、J. Immunol., 128巻、69~72(1982)]。

HBcAgはまた、タンパク分解酵素、還元剤、音波処理、カオトロブ剤(chaotropic agents)での処理、またはCaCl<sub>2</sub>中での勾配遠心を用いてHBcAgをHBsAgに変換することによって得る

128巻、69~72(1982)]。ヒト血清中にHBcAgが存在することは、高い感染性に関連しており、肝臓病の経過を予測する上で予後上価値を有する[マッケイら(MacKay et al)、J. Med. Virol., 8巻、237~243(1983)]。

HBcAgおよびHBsAgの両方ともデイン粒子のコアに結合しており[タカハシら(Takahashi et al)、J. Immunol., 22巻、275~279(1979)]、HBVゲノムの一つの領域にコードされている[ルーシンクラ(Roosinck et al)、Mol. Cell. Biol., 6巻、1393~1400(1986)]。したがって、予後指示薬としてのHBcAgの有用性にもかかわらず、イムノアッセイでの試薬として直接使用するためまたはそのようなイムノアッセイに使用するためのポリクローナル抗体もしくはモノクローナル抗体の産生を高めるために必要な、HBsAg活性およびHBcAg活性を有しないHBcAg調製物を製造することは困難である。

HBcAgの主要な採取源は、HBVに感染したこともできる[オーリイら(Ohori et al)、Intervirology, 13巻、74~82(1980)]。変換のためのHBcAgの採取源は、HBVに感染した患者の死後の肝臓である。肝臓由来のHBcAgからHBsAgを得るには、肝臓組織を抽出し、CsCl勾配上にベレット化して純粋なHBcAg調製物を得るようにしなければならない。ついでHBcAg調製物を、SDSおよびβ-メルカプトエタノールで処理してHBcAgが得られる[フェルンスら(Ferns et al)、J. Gen. Virol., 65巻、899~908(1984)]。しかしながら、感染された血清や組織を用いることは、それらに由来する抗原性調製物中に感染性の物質が保持されている危険性をはらんでいる。さらに、上記調製物では、HBcAgや他のHBV抗原でHBcAg調製物が汚染されることを完全に防ぐことはできない。

HBcAgを得る他の方法は、組換えHBcAgをタンパク分解酵素で消化する方法である(ヨーロッパ特許出願第75395号; およびマッケイら、

上述)。しかしながら、この方法で得られた HBeAg は HBcAg により相当汚染されており、低収率でしか回収することができない。

組換えプラスミドベクターを用いて哺乳類細胞中の HBV ゲノムのコア領域を発現させると HBeAg を分泌させることができる [ルーシングら、上述; ブルスら (Bruss et al)、B 型肝炎ウイルスの分子生物学に関する 1986 年学会における論文のアブストラクト (Abstracts of Papers Presented at the 1986 Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses)、8月28日～8月31日、1986、於ニューヨーク、コールドスプリングハーバー、コールドスプリングハーバーラボラトリー、アブストラクト No. 14 (1984); オウら (Ou et al)、B 型肝炎ウイルスの分子生物学に関する 1988 年学会における論文のアブストラクト、8月28日～8月31日、1986、於ニューヨーク、コールドスプリングハーバー、コールドスプリングハーバーラボラトリー、アブストラクト No. 15 (1982)]。

とができ [ブドコウスカ (Budkowska et al)、J. Immunol. Methods, 51 巻、341～346 (1982)]、また他の組換え発現産物をすばやく希釈して精製、変性したのち適当に復元させることもできる [(ブライアー (Prior et al)、PCT 公報 No. WO 85/05637)、組換え HBeAg (rDNA HBeAg) を変性および精製したのち HBcAg 活性をなくし HBeAg 活性のみを選択的に保持させるための方法が望まれている。

#### [発明の構成および効果]

本発明のポリヌクレオチドは、本質的に、HBcAg 免疫反応性および HBeAg 免疫反応性を有するポリペプチドをコードする核酸からなっており、このものは、カオトロプ (chaotrope) で変性させすみやかに非変性バッファー中に希釈したときに、HBcAg 免疫反応性は実質的になくなっているが HBeAg 免疫反応性は保持している。本発明の好ましいポリヌクレオチドは、第 8 図に示すポリヌクレオチドである。上記ポリヌクレオ

しかしながら、この方法によっても、HBeAg による汚染をなくすことはできない。

純粋な HBeAg を得る一つの方法は、HBeAg でない部分をコードする領域を取り除き (マッケイら、上述)、天然に存在する HBcAg をコードする配列のみを残すようにした [タカハシら、J. Immunol., 130 巻、2903～2907 (1983)] 組換え HBcAg コード配列の直接の遺伝子産物として HBeAg を表現することであると思われる。HBeAg コード領域の大腸菌遺伝子産物を産生することができるが [マ (Ma et al)、B 型肝炎ウイルスの分子生物学に関する 1986 年学会における論文のアブストラクト、8月28日～8月31日、1986、於ニューヨーク、コールドスプリングハーバー、コールドスプリングハーバーラボラトリー、アブストラクト No. 25]、この種の方法で得られる産物は HBcAg 活性が残っており、有用性が制限される。

さらに、SDS および 2-メルカプトエタノールで処理することにより HBcAg を失活させるこ

とを含む生物学的に機能をもつ DNA 形質転換ベクターで形質転換された細菌、酵母もしくは哺乳類細胞の発現産物であるポリペプチドもまた本発明において好ましい。

本発明によるポリペプチドは、イムノアッセイに直接使用することができ、リポーターグループもしくは支持体に結合させてそのようなアッセイに使用することができ、またポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を産生させるため、もしくはワクチン製品として使用することができる。

つぎに実施例を用いて本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例 1 では HBcAg 産生クローンの構築が記載される。実施例 2 では、実施例 1 の HBcAg 産生クローンの欠変異体の構築が説明される。実施例 3 は、HBeAg 発現産物および実施例 2 の欠変異体の免疫反応性についてのアッセイの結果を示す。実施例 4 では、実施例 2 の欠変異体からの HBeAg の産生および単離が説明される。実

施例5には、実質的にHBcAg活性をなくしHBcAg活性を保持するための精製および処理が記載される。実施例6では、EIAおよびRIA中和アッセイにおける本発明による組換えDNA HBcAgの性能が、ヒト血漿由来HBcAgの性能と比較される。実施例7では、本発明による組換えDNA HBcAgを用いた種々のイムノアッセイが記載される。実施例8では、本発明による抗血清およびポリクローナル抗体の製造が記載される。前記抗体は、HBcAgに特異的なものである。実施例9では、HBcAgに特異的な本発明によるモノクローナル抗体の製造が記載される。

#### 実施例1

HBcAg産生クローンを構築するためには、HBcAgの生合成が可能な構築をすることが必要であった。

デイン粒子(慢性的に感染した個人の血清から単離)から単離したHBV DNAのクローニングを、バレンツエラの文献[Valenzuela et al, Nature, 280巻、815~819(1977

かめるため、またHBcAgをコードする遺伝子の位置を知るために、第1図に示すような、HBVクローン(pHBV-8と称す)の詳細な制限エンドヌクレアーゼ地図を作成した。この地図は、制限部位の位置を決定するために適当な単一もしくは複数の酵素で消化することにより作成した。発行されている制限エンドヌクレアーゼ地図および配列データ[バレンツエラら、Animal Virus Genetics、ヤーニッシュら(Jaenish et al)編、アカデミックプレス、57~70(1980);ガリバートら(Galibert et al)、Nature、281巻、646~650(1979)]と比較することにより、HBsAgまたはHBcAgをコードしている可能性のあるウィルスDNAの領域を同定した。

組換えDNAクローンがHBcAg合成のための完全な遺伝子を含んでいるかどうかを決定するために、HBcAgをコードしていると思われる(上記で引用した発行された地図および塩基配列に基づいて)領域の塩基配列を、マキサムらの文献[Mixam et al, Methods Enzymol., 68巻、

9)]に記載の方法に従って行った。

上記DNAを、生体内DNAポリメラーゼ反応[フルスカら(Hruska et al), J. Virol., 23巻、368~376(1977)]により<sup>32</sup>P-ATPおよび<sup>32</sup>P-CTPで標示し、ランダースら[Landers et al, J. Virol., 23巻、368~376(1977)]の方法に従って精製した。単離した材料から精製されたDNAはエンドヌクレアーゼEcoRIで消化し、約3200塩基対(bp)の単一のEcoRI断片を得た。この3200bp断片をプラスミドpBR322のEcoRI部位に連結し、この連結産物で大腸菌chi-1776株を形質転換した。形質転換の結果得られたコロニーは、テトラサイクリンに対する感受性[ボリバーら(Bollivar et al), Gene, 2巻、95~113(1977)]およびプラスミドの分析[バーンズ(Barnes), Science, 195巻、393~394(1977)]によりスクリーニングした。

材料がクローン化されたHBVであることを確

499~560(1980)]に記載の方法によって決定した。pHBV-8のクローン化HBcAg部位のスクレオチド配列を第2図に示す。得られたDNA配列を発行された配列と比較することにより、HBcAgのコード領域は完全であることがわかった。それゆえ、そのクローン化HBV DNAを、細胞でのHBcAg合成のためのプラスミドを製造するために用いた。

本実施例および以下の実施例においてクローンの構築のために用いられた組換えDNA技術は、マニアティスらの文献[Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Maniatis et al, Cold Spring Laboratory, 75~186(1982)]に詳細に記載されている。HBcAgの合成のための分子構築は、第3図に図式的に説明されている。クローンpHBV-8のHBV DNA挿入体を制限エンドヌクレアーゼHhaI[ニュー・イングランド・バイオラプス、ビバリー、マサチューセツ(New England Biolabs, Beverly, Massachusetts)]で消化することから構築を始めた。消化は、製

造業者の説明書に従って、50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、5 mM  $MgCl_2$  および 0.5 mM ジチオトレイトールの存在下で行った。制限エンドスクレアーゼ地図作成および核酸配列分析によって、およびスクレオチド配列を発行された配列データ(バレンツエラら、上述)と比較することによって、上記消化の結果得られた 1 kbp DNA 断片が HBCAg のための完全なスクレオチド配列を含んでいることが判った。

組換えタンパク質の実質的な量を得るために、 $\beta$ -ガラクトシダーゼをコードするプラスミド由来の遺伝子にクローン化 DNA を融合することができ、この融合は、 $\beta$ -ガラクトシダーゼの  $\alpha$ -サブユニットをコードする領域内の「普通クローン化部位」を使用することによりなされる。 $\beta$ -ガラクトシダーゼと HBCAg との間の融合物は安定である [スतालら (Stahl et al), Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA), 79 巻, 1606 ~ 1610 (1982)]。

プラスミド pUC9 [ビー・エル・バイオケミ

参照)。この酵素は、種々の長さの DNA 断片が得られるように DNA 分子の両末端から塩基を取り除く。BAL 31 (ニュー・イングランド・バイオラブズ) は製造業者の説明書に従って使用し、消化は、600 mM NaCl、12 mM  $CaCl_2$ 、12 mM  $MgCl_2$ 、20 mM Tris-HCl (pH 8.0) および 1.0 mM EDTA の存在の下で行った。消化の程度をモニターするために、EDTA を 33 mM まで加えフェノール抽出することによって反応を 1, 2, 4, 6 および 8 分に停止させた。生成物をアゲロースゲル上の電気泳動により分析した。

スクレアーゼ BAL 31 処理によって生成した分子がプラントエンドを有していることを確認するために、一本鎖の特異的エンドスクレアーゼであるヤエナリヌクレアーゼ (mung bean nuclease) およびプラントエンドを有する DNA 分子を生成することのできる酵素である T4 DNA ポリメラーゼでこれらの分子を処理した。ヤエナリヌクレアーゼ (ビー・エル・バイオケミカル

カルズ, P. L. Biochemicals, Milwaukee, Wisconsin)] を発現ベクターとして選択した。

このプラスミドは、各細胞中で少なくとも 10 ~ 15 コピーの遺伝子を発現し続けることができる。この遺伝子は、大腸菌 JM103 および JM83 株(ともにビー・エル・バイオケミカルズより入手可)中で  $\beta$ -ガラクトシダーゼを合成するために必要な遺伝子を含んでいる。

「遺伝子(細菌宿主 JM103 または JM83 株のゲノム内)を、 $\beta$ -ガラクトシダーゼプロモーター(P<sub>lac</sub>)から転写される遺伝子の発現をコントロールするために用いることができる。タンパク質産物が宿主に対して毒性を有する場合には上記コントロールはきわめて有用である。

HBCAg をコードする領域の両側面に位置する部分は、肝炎 DNA の非コード配列である。それゆえ、これらの非コード領域は、最大の HBCAg 産生が得られるように注意深く削り取った。それは、HhaI DNA 断片をスクレアーゼ BAL 31 による消化に供することにより行なった(第4図

ズ)は製造業者の説明書に従って使用し、BAL 31 処理した DNA の消化は、20 mM 酢酸ナトリウム (pH 4.6)、50 mM NaCl、1 mM 硫酸亜鉛の存在下、37°C で 30 分間行なった。反応生成物は、ついでフェノール抽出しエタノールで沈澱させた。これらの生成物は、遠心分離し水中に溶解することによって回収したのち、製造業者の説明書に従って T4 DNA ポリメラーゼ (ビー・エル・バイオケミカルズ) で処理した。反応は、67 mM Tris-酢酸 (pH 6.7)、10 mM  $MgCl_2$ 、5 mM ジチオトレイトール、50  $\mu$ g / ml BSA、および各 33 mM の dTTP, dCTP, dGTP, dATP の存在下で行った。反応混合物を 15°C で 30 分間、37°C で 10 分間インキュベートした。反応混合物中の生成物をアゲロースゲル電気泳動によって分離し、大きさが 700 ~ 900 塩基対の断片を電気泳動によってブールしエタノール沈澱によって収集した。

ブールし収集した HhaI 処理断片は、ついで SmaI で切断した pUC9 DNA [ベセスダ・リ

サーチ・ラブズ、ゲイターバーグ、メリーランド (Bethesda Research Labs, Gaithersburg, Maryland) と等モル比で結合させた。上記DNAをエタノールで再沈殿させ、ついでベレット化して凍結乾燥した。試料を水中に溶かし、最終濃度で50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、20 mM ジチオトレイトール、1 mM ATP、10 mM  $MgCl_2$ にした。ついでT4 DNAリガーゼ(ビー・エル・バイオケミカルズ)を加え、4℃で48時間連結反応を行った。

得られた連結DNA分子を、マンデルらの文献 [Mandel et al, J. Mol. Biol., 53巻、154(1970)] に記載の方法にしたがって、大腸菌JM83株のトランスフェクションに使用した。JM83株細胞を一夜培養したもの0.5 mlを、新鮮なNZY培地 [蒸留水14中にN-ZアミンタイプA (N-Z Amine type A, Humko Sheffield, Memphis, Tennessee) 10 g、NaCl 5 g、 $MgCl_2 \cdot 7H_2O$  2 g、酵母エキス5 g、pHは6 N NaOHで7.0に調整] 5

ランスレーションにより、それ用のキット [アマーシャム、アーリントン・ハイツ、イリノイ (Amersham, Arlington Heights, Illinois)] を用いて<sup>32</sup>Pで標識した。このプローブを、以降の細菌コロニーの同定に利用した。

個々の細菌コロニーを、lacプロモーターの制御下で遺伝子の発現を誘発する化学物質であるIPTG(ベセスダ・サーチ・ラブズ)  $4 \times 10^{-4}$  Mの存在下、NZY培地20 ml中で一夜増殖させた。細菌細胞培養液を以下のようにして調製した [スतालら、Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 79巻、1606~1610(1982)]。細胞を25%シロ糖0.075 mlおよび50 mM Trisバッファー(pH 8)中に再び懸濁した。0.25 M Trisバッファー(pH 8)25 μlおよび0.25 M EDTAを加え、細胞を氷水浴中に5分間放置した。つぎに、1% Triton X-100<sup>®</sup>界面活性剤 [シグマ・ケミカル・カンパニー (Sigma Chemical Company)]、0.4%デオキシコール酸ナトリウム、50 mM Trisバッ

0 ml中にすばやく接種し37℃で2時間増殖させた。ついで細菌細胞をベレット化し、10 mM NaCl 25 ml中で2回洗浄した。最終のベレットを30 mM  $CaCl_2$  25 ml中に再び懸濁し、氷浴に30分間放置した。この細胞をベレット化し、30 mM  $CaCl_2$  1.5 ml中に再び懸濁した。この細胞は、形質転換に適したものであった。細胞懸濁液200 μlに連結DNA 1 μgを加えた。細胞を氷上に5分間放置し、ついで42℃で2分間インキュベートすることによって熱ショックに付した。各トランスフェクションにNZY培地2.5 mlを加え、細胞を37℃で1.5時間インキュベートした。寒天1.5%およびアンピシリン40 μg/mlを加えたNZY培地を含むプレート上に細胞を広げた。プレートを37℃で一夜間インキュベートした。ついで、細菌コロニーをコロニーハイブリダイゼーション [マニアティスら、上述(1982)] に付してHBcAg遺伝子の挿入をスクリーニングした。HBcAgをコードする配列のみであると同定されたBgI<sup>®</sup>断片を、ニックト

ファー(pH 8)および62.5 mM EDTAの溶液0.12 mlを加えたのち、得られた細胞懸濁液を氷水浴中に0℃で10分間放置した。

細胞懸濁液をフルパワーで30秒間3回音波処理した。音波処理物を75 T1ローター [ベックマン・インダストリーズ、パロ・アルト、カリフォルニア (Beckmann Industries, Palo Alto, California)] 中で30,000 rpmで30分間遠心分離することにより清澄化した。

HBcAg遺伝子挿入物を有するプラスミドを含む個々の細菌コロニー(クローン)に由来する清澄化した音波処理物を、以下の方法によりHBcAg活性について免疫学的にスクリーニングした。清澄化した細菌培養液の試料0.2 mlを、いくつかのアッセイウェルの各々に加えた。抗HBcで覆われたビーズ [アボット・ラボラトリーズ (Abbott Laboratories)] をウェルに加え、室温で24時間インキュベートした。これらのビーズは、ついで水で3回洗浄した。<sup>125</sup>Iで標識した抗HBc(放射活性最大7.7 μCi/ml;アボット

ト・ラボラトリーズより入手可)0.2mlを各ウェルに加え、45 H BcAg Cで4時間インキュベートした。つぎにビーズを水で3回洗浄し、ガンマカウンター(ANSR<sup>®</sup> 器具、アボット・ラボラトリーズ)中でガンマ放射をカウントした。

幾つかの細菌コロニーが、細菌中でH BcAgの生合成を行い得ることが見出された。異なったクローンがスクリーニングされた場合、H BcAg産生のレベルにおいて200倍もの違いがあった。この違いは、各クローンで異なる構築の一次構造に依存していることがわかった。H BcAgを最も高いレベルで産生したクローンは、12.88bと表した。クローン12.88bのコードストランドの一次構造をDNAシーケンシング【マキサムら、Methods Enzymol., 68巻、499~560(1980)】により決定し、第3図に示した。核酸配列から導き出されたH BcAgタンパク質融合ペプチドのアミノ酸配列を、第5図に示す。

同様に、単離されたHaeIII断片をHpaIIで消化することによってクローン18系列プラスミドが得られた。HpaIIでの消化はDNA分子上に付着端を生じるので、系列16のHpaII断片の末端はT4 DNAポリメラーゼを用いて塞ぎ、プラントエンド化された分子を得るようにする。

15および16の同系列消化物からのプラントエンド化された分子をHindIIIで切断し、ついでHindIIIおよびSmaIで切断されたpUC9プラスミドに連結し、これを大腸菌JM83株の細胞を形質転換するために用いた。

クローン18系列プラスミドは、クローン12.88bからH BcAg DNA配列が内部欠失したものである。クローン12.88bをBglIIで消化した。この消化物からの最も大きな断片は、pUC9プラスミドDNA、および内部のコアをコードする配列が欠失したH BcAg DNAを含んでいた。この断片を、実施例1と同様にし、再び環状化し、連結し、ついで大腸菌JM83株の細胞の形質転換に供すると、H BcAg遺伝

## 実施例2

H BcAg産生クローンの欠失変異体を、第6図に示すようにして構築した。3系列の構築物を作製した。クローン12.88bに対するそれらの関係を第7図に示す。制限酵素による消化を製造業者の説明書に従って行い、実施例1と同様にして連結反応を行った。

系列15および16の構築物は、実施例1の手順に従ってクローン12.88bからプラスミドを単離し、得られたプラスミドをHaeIIIで消化することによって調製した。

ついで、H BcAg遺伝子内にプラントエンド切断を生じるRsaI(ニュー・イングランド・バイオラブズ)でHaeIII断片を制限エンドヌクレアーゼ開裂することによりクローン15系列プラスミドを得た。得られたDNA断片は、ついで制限エンドヌクレアーゼHindIII(ベセスダ・リサーチ・ラブズ)で消化し、ついでSmaIおよびHindIIIで切断されたpUC9プラスミドDNAに直接連結した。

子の5'末端からのコード配列100bpおよびH BcAg遺伝子の3'末端からの30bpが単一のmRNAに転写された。上記コード配列の3'末端は、第5図に示したクローン12.88bの配列に基づく5'コード配列と同じフレーム内にあるので、その領域によりコードされるタンパク質は、H BcAgのアミノ末端アミノ酸およびカルボキシル末端アミノ酸の両方を有する。

大腸菌JM83株をクローン15,16,および18系列プラスミドで形質転換したのち、形質転換体を実施例1の手順に従いコロニーハイブリダイゼーションによってスクリーニングした。実施例1に記載したH BcAg DNAに特異的なプローブとハイブリダイズしたコロニーを、ついでH BcAg免疫反応性について分析した。

## 実施例3

各系列の一つのプラスミドを有する細胞を含む個々の細菌コロニーを、lacプロモーターの制御下で遺伝子の発現を誘発する化学物質であるインプロビルチオ-β-ガラクトシド(IPTG)4×



10<sup>4</sup>Mの存在下、NZY培地中で一夜増殖させた。細菌細胞培養液を実施例1に記載したようにして調製し、ついで実施例5に一般的に記載されているようにしてHBcAgおよびHBeAgの両方について分析した。

HBcAgアッセイは実施例1に記載したようにして行った。このアッセイの結果を第1表に示す。

HBeAgアッセイでは、清澄化した細菌培養液の試料0.2mlを、いくつかのアッセイウェルの各々に加えた。抗HBeでコーティングしたビーズ(アボット・ラボラトリーズ)をウェルに加え、室温で24時間インキュベートした。ついでビーズを水で3回洗浄したあと、<sup>125</sup>Iで標識した抗HBe(放射活性最大3.8μCi/ml、アボット・ラボラトリーズ)0.2mlを各ウェルに加えた。このアッセイの結果もまた第1表に示す。

し得ることを示している。

クローン16.4の配列を決定した。その結果を第8図に示す。クローン16.4のDNA配列を分析したところ、HBcAgコード配列の120bpが3'末端から欠失していることが見出された。このことは、タンパク質のカルボキシル末端から40個のHBcAgコードアミノ酸が欠損し、また細菌プラスミド配列との融合による9アミノ酸が添加されたことになる。クローン16.4の構築に就いて、天然のHBeAgのカルボキシル末端配列を決定した[タカハシら(Takahashi et al), J. Immunol., 130巻, 2903~2907 (1983)]。HBeAgのカルボキシル末端アミノ酸は、-Thr-Thr-Val-Valまたは-Thr-Thrであり、一方、クローン16.4においてコードされたHBeAgのカルボキシル末端アミノ酸は-Leu-Pro-Gluである。これらのアミノ酸は、天然のHBeAgに見られるThr-Thrのすぐ隣にある。それゆえ、クローン16.4により産生された抗原は、天然のHBeAgに見られるア

第1表

	HBcAg試験 C.P.M	HBeAg試験 C.P.M
クローン 15.3	28,000	46,000
クローン 15.8	24,000	15,000
クローン 15.10	6,000	9,000
クローン 16.2	118,442	172,830
クローン 16.4	89,206	163,280
クローン 18	3,500	7,200
クローン 12.88b	120,424	30,000
陰性対照 (PBS+10%胎子血清)	500	300

各系列のすべてのクローンを両方のアッセイで反応させた。期待されたように、発現プラスミド中に残ったHBcAgコード配列が少なくなればなるほど、HBcAgアッセイ反応性は少なくなった。HBcAgおよびHBeAgアッセイでのクローン16.2およびクローン16.4の発現産物が相対的な反応性を示すことから、これら二つのクローンは天然のHBeAgに類似したポリペプチドを発現

ミノ酸の2~4個が欠落している。

天然におけるHBcAgのHBeAgへの変換は、抗原のタンパク質分解酵素による開裂とタンパク質の3次構造の変化とを含む2工程でおこなわれるものと思われる。タンパク質分解酵素による開裂の工程は、本発明ではHBcAgコード配列の欠失で置き換えられている。欠失変異体クローン16.4は、そのタンパク質がβ-ガラクトシダーゼのα-サブユニットに融合され、また抗原産生細胞から抽出されたときに、集合した複合体として存在する他は、天然のHBeAgに非常によく似たタンパク質を産生する。これらの分子集合体の変性は、分子が真のHBeAg特性を有するようになるために必要であるように思われる。変性によるこの効果は、クローン12.88b抗原およびクローン16.2抗原を種々の変性条件に処理したときの比較から明らかである。

クローン12.88bおよびクローン16.2からの細菌抗原(すでに記載したようにして調製)の当量を試験管に等分に分け、塩およびバッファ

濃度を所望の最終濃度に調整した。処理Ⅰに供した試験管には、10mM Tris-HCl (pH 7.5)、100mM NaClおよび1mM EDTAを加えた。処理Ⅱに供した試験管には、50mM Tris-HCl (pH 8.5)、8M GuHCl、6mM EDTAおよび6mM ジチオトレイトールを加えた。処理Ⅲに供した試験管には、10mM Tris-HCl (pH 7.5)、100mM NaCl、1mM EDTA、0.1%ドデシル硫酸ナトリウムおよび10mM  $\beta$ -メルカプトエタノールを加えた。ついで、これらのバッファー中の抗原を45℃で30分間加熱した。調製物は、ついで10mM Tris-HCl (pH 7.5)、100mM NaClおよび1mM EDTAを含むバッファーに対し徹底的に透析した。ついで抗原調製物は、すでに述べたようなHBcAgおよびHBsAgアッセイにてそれらの反応性について分析した。すべての結果は、抗原を非変性条件にさらすバッファーを用いた処理Ⅰの結果を基準にして表わした。結果を第2表に示す。第2表は、HBcAgにおけるHBsAg

2.88bのHBcAg遺伝子産物全体を変性条件に供しても、分子上のHBcAg反応性エピトープを取り除くことはできない。欠変異体16.2を変性剤で処理することのみが、HBsAgアッセイにおいて優先的に反応性を示す材料を提供することができる。これらの結果は、HBsAgにのみ反応性を示す分子が欠変および変性によって生成させ得ることを示す最初のものであった。

#### 実施例4

クローン16.2の増殖およびHBsAgの単離を以下のようにして行った。それぞれNZY+チアミンブロス [ディフコ、デトロイト、ミシガン (Difco, Detroit, Michigan)] 2gを入れた4g フラスコ5本を調製し、製造業者の説明書に従ってオートクレーブに付した。培地を冷却すると同時にアンピシリン200mgおよびIPTG (シグマ・ケミカル・カンパニー) を各フラスコに無菌的に加え、攪拌して混合した。

夜のうちに開始した培養液から大腸菌15mlを各フラスコにとり、 $200 \pm 25$  rpm、37℃で

イムノアッセイにおける組換えDNA HBcAgおよびHBsAgの反応性に対する変性の効果を示すものである。

第2表

処理	クローン12.88b抗原		クローン16.2抗原	
	HBcAg アッセイ	HBsAg アッセイ	HBcAg アッセイ	HBsAg アッセイ
I	100%	100%	100%	100%
II	113%	130%	8%	103%
III	124%	146%	18%	107%

上記の結果から明らかなように、クローン12.88bおよびクローン16.2からのタンパク質を非変性条件に供するとHBcAgおよびHBsAgの両方のアッセイにおいて反応性のタンパク質となることから、HBcAg遺伝子配列の欠変が、純粋にHBsAg反応性の分子を生成させるには不充分である。さらに、クローン12.88bについての処理Ⅱ、ⅢおよびHBcAgとHBsAgアッセイにおける反応性に示されているように、クローン1

22±6時間攪拌した。インキュベーション後、5本のフラスコはかなりの細菌性生物量を有していることが視覚的に認められた。細菌は、 $10 \times 410 \times g$ 、2~8℃で20分間ベレット化し、清澄された培地は捨てた。ベレットは、残る手順のために氷上に置いた。ベレットを、M9最小塩溶液 (ディフコ、デトロイト、ミシガン) と2% グルコースとの懸濁液300mlに再び懸濁し、プールした。細菌懸濁液を再び上記のようにしてベレット化し、上澄み液を捨てた。

0.05M Tris (pH 8.0) に25%シロ糖を加えたバッファー67.5mlを含む溶液を細菌ベレットに加え、ベレットをバスツールピペットで再び懸濁して細菌の懸集塊をばらばらにした。0.25M Trisおよび0.25M EDTA (pH 8.0) からなるバッファーを調製し、25mlを細菌懸濁液に加えた。懸濁液を攪拌し、氷上に放置して10分間インキュベートした。細菌バッファー [0.5mM Tris、1% Triron X-100®、0.01M EDTA、アプロチニン1mgおよび

フェニルメチルスルホニルフラ化物(PMSF)22mgを前もって冷却し、この溶菌バッファー108mlを上記細菌懸濁液に加えた。得られた溶液を、各サイクルの間を1もしくは2分間あけて、それぞれビブラーセル(Vibra-Cell)音波処理器[サイエンス・アンド・マテリアルズ・インコーポレーテッド、ダンベリー、コネチカット(Science and Materials Inc., Danbury, Connecticut)]を用い、30秒間10回音波処理した。

音波処理した細菌懸濁液を各遠心管に振り分け、135,000×gで30分間回転させて溶液を清澄化した。運転を終えると、組換えタンパク質を含む清澄化した溶菌液をデカントにより取得し、ペレットは捨てた。溶菌液を直線シシ糖勾配(0%~60%)に置き、18~24時間遠心分離した。各フラクションを集め、市販の診断試験キット(Abbott-HBeとしてアボット・ラボラトリーズから入手可)を用いてHBeAg活性の存在についてアッセイした。最も高いHBeAg活性を有

血漿で1:100に希釈した。

第3表

	比活性 (抗原活性/μgタンパク質)	
	HBeAg活性	HBeAg活性
変性前	$4.2 \times 10^4$	$1.2 \times 10^4$
変性後、すばやく 1:100希釈した 非透析材料	$3.84 \times 10^4$	-0-
変性後、透析した 材料	$7.72 \times 10^4$	$1.06 \times 10^4$

第3表の結果から明らかなように、変性させたタンパク質溶液を透析するとHBeAg活性が増加する。それゆえ、透析は、実質的にHBeAg活性がなく有意のHBeAg活性を有する材料を得る方法としては適当ではない。材料を直接1:100に希釈する方法を用いるべきである。

第3表において、抗原活性は、試料を希釈因子により増幅して得られるA<sub>492</sub>またはcpmとして測定される。変性前に行なわれたアッセイはエンザイムイムノアッセイ(EIA)であり、その結果は

するフラクションをブールし、変性の工程まで保管した。得られたシシ糖勾配ブールは、上述したHBeAgアッセイで試験したように、中位の程度のHBeAg活性とともに有意のHBeAg活性を示す。

上記フラクションを変性および希釈の工程に付すことにより、高いHBeAg活性を有し、HBeAg活性の欠けたポリペプチド産物が得られる。この工程には、カオトロブ剤、好ましくは8M塩酸グアニジン(GuHCl)中で組換えタンパク質を変性させ、続いて非変性剤、好ましくはヒト血漿中で速やかに希釈することが含まれる。

## 実施例5

50mM Tris(pH 8.5)中の10M GuHCl 52mlを、蒸留水中の0.1M EDTA 4.0ml、蒸留水中の0.1Mジチオトレイトール(DTT) 4.0ml、およびクローン16.4のシシ糖ブール 5.0mlに加えた。この溶液を混合し、45℃の水浴中に置き、この温度で30分間インキュベートした。変性させたHBeAg溶液を、直ちにヒト

希釈因子により増幅したA<sub>492</sub>として示されている。変性後に行なわれたアッセイはラジオイムノアッセイであり、それゆえ結果は試料を希釈因子により増幅したcpmとして表されている。非透析材料のHBeAg活性アッセイにおける「-0-」の値は、試料のcpmがアッセイの基底値と等価であることを示している。

一般に、本発明による抗原の復元のための特定の条件の有効性は、ムシャワールらの文献[(Mushahwar et al, J. Med. Virol., 2巻, 77(1978))]に記載されているようなHBeAgアッセイにおいてHBeAg活性が存在することに加えて、パーセルらの文献[(Purcell et al, Intervirology, 2巻, 231(1973))]に記載されているようなHBeAgアッセイで試験されたときに、同じ材料について実質的にHBeAg活性がないということによって決定することができる。

HBeAgアッセイは、文献記載のとおりに行った。高い抗HBe力価を有するが抗HBeの検出さ

れない(市販のキット、アボット・ラボラトリーズにより決定)ヒト血清からの精製したIgGを、1/4インチのポリスチレンビーズ上にコーティングした。抗HBcAgのコーティング濃度は10~30ng/mlであった。これらのコーティングしたビーズを、試料とともに40℃で2時間、または室温で一晩インキュベートした。ビーズを洗浄し、ついで、クロロミンTを用い<sup>125</sup>Iで標識するかまたはナカネ[Nakane, J. Histochem. Cytochem., 22巻, 1084(1974)]の方法により西洋ワサビペルオキシダーゼと複合した精製ヒト抗HBcととともにインキュベートした。40℃で2時間インキュベートしたのち、ビーズを洗浄し、RIAの手法により放射活性をカウントするか、またはEIAの手法によりOPD(オーフェニレンジアミン)を含む溶液中加入、室温で30分間インキュベートしたのち、OPD溶液吸光度を分光光度計で測定した。

本実施例に記載された組換えDNA HBsAgは、陰性(negative)ヒト血清中にさらに希釈し、

(カットオフ)と同等またはそれ以下のカウント/分または吸光度を有する試料は、反応性(「陽性」)とみなされる。

一般に、HBsAg中和剤の供給源はヒト血清である。実施例5で製造された組換えDNA由来のHBsAg(組換えDNA HBsAg)は、ヒト血清から単離されたHBsAgと免疫原性において同一である。組換えDNA HBsAgを含む中和剤は、抗HBsアッセイにおいてヒト血清由来中和剤(hpHBsAg)の代わりに用いることができる。データは、抗HBs試験におけるRIAおよびEIAの両手法において、組換えDNA HBsAg中和剤を使用することによって血清由来の中和剤を使用するよりも一層優れた感受性が得られることを示している。

B型肝炎表面抗原(HBsAg)に対し陽性と分析された試料を用いると、組換えDNA HBsAg中和剤を血清由来中和剤の代わりに用いた場合に、抗HBs RIA試験では98%の一致、抗HBs EIA試験では99%の一致がえられた。すべて

以下に記載する抗HBsイムノアッセイにおいて中和剤として用いることができる。組換えDNA HBsAgはまた、標準タンパク濃縮法(すなわち真空透析)により濃縮することができる。

#### 実施例6

抗HBs試験のRIAおよびEIAの両手法において、抗HBsでコーティングしたビーズを、患者の試料、およびHBsAgを含む中和剤とともに同時にインキュベートする。患者試料中に存在する抗HBsは、中和剤中のHBsAgがビーズに結合するのを妨げるであろう。この最初のインキュベーションの後、結合しなかった材料はビーズを洗浄することにより取り除く。ついでビーズを、<sup>125</sup>Iで標識した抗HBs(RIA手法)かまたは西洋ワサビペルオキシダーゼと複合した抗HBs(EIA手法)を用いて第2工程でインキュベートする。RIA手法では、ビーズを洗浄し、直ちに放射活性をカウントする。EIA手法では、ビーズを酵素基質とともにインキュベートして色の変化を生じさせ、ついで吸光度を決定する。計算値

の一致しない試料は、血清由来の中和剤を用いた抗HBsについては陰性であったが、組換えDNA HBsAg中和剤を用いた抗HBsAgについては陽性であった。これらの不一致は、組換えDNA HBsAg中和剤を用いたときに試験の感受性が増大した結果によるものである。特異性は、HBsAg陰性の試料を試験することにより決定した。データは、抗HBs EIA試験において、血清由来の中和剤と組換えDNA HBsAg中和剤との間で99.7%の一致があることを示した。

組換えDNA HBsAg中和剤およびその等価物である血清由来の中和剤の特異性を証明するために、HBsAg陰性血清の約200試料における抗HBsの頻度分布を調べた。

HBsAg陰性血清における抗HBs反応性試料の頻度分布は、RIA(アボットHBs、アボット・ラボラトリーズ)については第9および10図に、EIA(アボットHBs EIA、アボット・ラボラトリーズ)については第11および12図にそれぞれ示されている。データは、%中和に対する

頻度(試料数)としてプロットされている。両試験における%中和は、以下のようにして決定される。

$$\%N = \frac{NCM - SM}{NCM - PCM} \times 100$$

(式中、%Nは%中和、NCMは陰性対照平均、SMは試料平均、PCMは陽性対照平均をそれぞれ表す)

%中和が50%より大きい試料は、反応性とみなされる。

第4表に示すように、RIAにより試験した200個のHBsAg陽性血清の集団において、組換えDNA HBsAg中和剤を用いたときに1個の試料が抗HBeに対して反応性であることがわかった。この試料は、カットオフ値をやっと上回っていた。血漿由来中和剤では、抗HBsAgに対して反応性の試料は見出されなかった。全体の一致は99.50%であった。

同じく第4表に示されているように、200個のHBsAg陽性試料をアボットHBe EIAで試験したときに、どちらの中和剤を用いてもすべ

和剤とを比較するために、200個の血清試料のHBsAg陽性集団における抗HBeの頻度分布を測定した。組換えDNA HBsAg中和剤およびhpHBsAg中和剤を用いたRIAおよびEIAにおける抗HBe反応性試料の頻度分布を、第13、14、15および16図にそれぞれ示す。

RIAにより試験したHBsAg陽性試料の集団において、現行の中和剤では64個の試料が陰性であった。組換えDNA HBsAg中和剤を用いると、60個の試料が陰性であった。第5表に示すように、両アッセイの間の一致度は98.0%である。

同じ集団をEIAで試験したときに、現行の中和剤を用いると60個の試料が陰性であった。組換えDNA HBsAg中和剤を用いると、58個の試料が陰性であった。同じく第5表に示されているように、この場合の両アッセイの間の一致度は99.0%である。

の試料が陰性であった。したがって、一致は100%であった。

第4表

HBsAg陽性集団			
		組換えDNA	HBsAg
		陽性	陰性
hpHBsAg	陽性	0	0
	陰性	1	199
一致=199/200=99.5%			
組換えDNA HBsAg			
		陽性	陰性
hpHBsAg	陽性	0	0
	陰性	0	200
一致=200/200=100%			

これらのデータは、陰性集団を評価したときに、組換えDNA HBsAg中和剤を用いることがhpHBsAg中和剤と同様の特異性を示すものであることを証明している。

組換えDNA HBsAg中和剤とhpHBsAg中

第5表

HBsAg陽性集団			
		組換えDNA	HBsAg
		陽性	陰性
hpHBsAg	陽性	136	0
	陰性	4	60
196/200=98.0%一致			
組換えDNA HBsAg			
		陽性	陰性
hpHBsAg	陽性	140	0
	陰性	2	58
198/200=99.0%一致			

これらの結果は、組換えDNA HBsAg中和剤とhpHBsAg中和剤との間の全体的な一致度が98.5%であることを示している。hpHBsAg中和剤を用いて陽性と分析されるすべての試料はまた、組換えDNA HBsAg中和剤を用いても陽性である。すべての一致しない試料はhpHBsAg中和剤を用いて陰性と分析されるが、組換え

DNA HBeAg中和剤を用いると陽性と分析される。これらの試料はHBeAg陽性であることが知られているので、組換えDNA中和剤とhpHBeAg中和剤との間の不一致は、組換えDNA由来の中和剤を用いたことにより感受性が増大した結果である。

5個の抗HBe陽性試料の倍散希釈体について、hpHBeAg中和剤および組換えDNA HBeAg中和剤の両方を用い、RIAおよびEIAによりアッセイした。

第6表に示すように、組換えDNA HBeAg中和剤を用いた抗HBe試験は、5個の試料のすべてについて、現行の中和剤を用いた抗HBe試験と同等またはそれ以上の優れた感受性を示している。第6表は、アボット抗HBe RIAおよびEIAにおいて組換えDNA HBeAg中和剤を現行のhpHBeAg中和剤と比較した相互最終希釈倍数(reciprocal endpoint dilutions)を表す。

抗血清を製造するために、またはモノクローナル抗体を製造するために動物を免疫するのに用いることができる。さらに、精製されたHBeAg調製物は、B型肝炎ウイルスの感染を防御するためのワクチンとして用いることができる。これらの抗体は、患者におけるHBeAgまたはその対応する抗体(抗HBe)の存在を検出するために、従来のラジオイムノアッセイまたはエンザイムイムノアッセイに組み込むことができる。主要な利点は、HBeAg調製物が連続的に得られることと、その均一性にある。本発明に従って製造される精製組換えHBeAgは、天然のHBeAgに比べて非常に安定である。

#### 実施例7

本実施例においては、HBeAgに対する抗体を検出するために本発明による組換えHBeAgを利用した他のイムノアッセイについて記載する。

抗HBeを検出するための幾つかのイムノアッセイを、組換えDNA HBeAgを用いて展開した。その三つの例を以下に述べる。

第6表

試料	アボット抗HBe RIA		アボット抗HBe EIA	
	hpHBeAg	組換えDNA HBeAg	hpHBeAg	組換えDNA HBeAg
1	1	4	2	8
2	2	2	1	4
3	8	>16	4	8
4	1	2	-	2
5	4	4	1	8

これらのデータは、中和剤に組換えDNA HBeAgを使用することによってhpHBeAg中和剤よりも大きな感受性が得られることを示している。ここに記載した方法による組換えDNA由来のHBeAgの精製によれば、血清HBeAgの精製によるか、またはHBeAg調製物から一層複雑な工程によりHBeAgを製造することにより得られるよりも、高度に精製されたHBeAg調製物が一層大量に一つの精製工程で得られる。

精製されたHBeAg調製物は、ポリクローナル

A) 組換えDNA HBeAgは、HBeAgに対する抗体を検出するためにサンドイッチアッセイに使用することができる。このアッセイでは、組換えDNA HBeAgでコーティングした固相(マイクロタイター、ポリスチレンビーズ、マイクロビーズ)を試料とともにインキュベートし、洗浄し、ついでRIAのために放射線検出するかEIAのために酵素と複合した組換えDNA HBeAgを含む溶液と反応させる。

B) 組換えDNA HBeAgは、コンペティティブイムノアッセイに用いることができる。このアッセイでは、組換えDNA HBeAgを固相上にコーティングし、試験試料および標識した抗HBeAg抗体(ポリクローナルかまたはモノクローナル)とともにインキュベートする。もしHBeAgに対する抗体が試験試料中に存在するならば、この抗体は標識した抗HBeが固相に結合するのに対し拮抗するであろう。

C) 組換えHBeAgを固相上にコーティングし、試験試料(ヒト血清)とともにインキュベート

する。固相を洗浄し、ついでヤギ抗ヒトIgGやヤギ抗ヒトIgMのような標識した抗ヒト抗体とともにインキュベートする。

#### 実施例8

精製した組換えDNA HBeAgは、抗血清を製造するために用いることができる。

抗血清は、以下のようにして本発明による精製ポリペプチドを注射してウサギを免疫することによって特異的に製造することができる。最初の接種物は、抗原および完全フロイドアジュバントを含む。次の接種物は、抗原および0.25mgの不完全フロイドアジュバントを含む。動物から採血して血清を得る。ポリクローナル抗体は、アフィニティクロマトグラフィーにより血清から単離することができる。

#### 実施例9

本発明によるモノクローナル抗体は、グリーンバーグら [Greenberg et al., Infect. Immun., 39巻, 91~99 (1983)] の方法に従い、そこで用いられている免疫原細胞を本発明によ

地図を表す。第2図は、プラスミドpHBV-8のB型肝炎ウイルスコア遺伝子のヌクレオチド配列を表す。第3図は、HBeAg産生の組換えDNAの構築を表すフローチャートである。第4図は、HBeAgを発現するクローンの構築を表すフローチャートである。第5図は、クローン12.88bのコードストランドのヌクレオチド配列およびそれから導き出されたアミノ酸配列を表す。第6図は、クローン12.88bの欠変異体の構築を表すフローチャートである。第7図は、欠変異体構築物をもとのクローン12.88bと比較したものである。第8図は、クローン16.4のヌクレオチド配列およびそれから導き出されたアミノ酸配列を表す。第9図は、HBsAg陽性集団で行なわれた抗HBe RIAにおける本発明による組換えDNA HBeAgの%中和の頻度分布を表すグラフである。第10図は、HBsAg陽性集団で行なわれた抗HBe RIAにおけるヒト血漿由来HBeAgの%中和の頻度分布を表すグラフである。第11図は、HBsAg陽性集団で行な

る濃縮した組換えDNA HBeAgの溶液で置き換えることによって製造することができる。

基本的に、モノクローナル抗体は、実施例5に記載したように免疫量の組換えDNA HBeAgタンパク質をマウスに注射することによって製造することができる。免疫された動物から脾臓を取り、ポリエチレングリコールのような融合原を用いて脾臓細胞をミエロマ細胞(たとえばNS-1細胞)と融合させる。モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞をHAT培地中で選択する。組換えDNA HBeAgタンパク質に特異的なモノクローナル抗体は、上記ハイブリドーマ細胞を培養した培地からアフィニティクロマトグラフィーによって単離することができる。これらのモノクローナルおよびポリクローナル抗体は、HBeAgおよび抗HBeイムノアッセイを展開するために用いることができる。

#### 4. 図面の簡単な説明

第1図は、プラスミドpHBV-8のB型肝炎ウイルスDNA挿入体の制限エンドスクレーゼ

われた抗HBe EIAにおける本発明による組換えDNA HBeAgの%中和の頻度分布を表すグラフである。第2図は、HBsAg陽性集団で行なわれた抗HBe EIAにおけるヒト血漿由来HBeAgの%中和の頻度分布を表すグラフである。第3図は、HBsAg陽性集団で行なわれた抗HBe RIAにおけるヒト血漿由来HBeAgの%中和の頻度分布を表すグラフである。第4図は、HBsAg陽性集団で行なわれた抗HBe RIAにおける本発明による組換えDNA HBeAgの%中和の頻度分布を表すグラフである。第5図は、HBsAg陽性集団で行なわれた抗HBe EIAにおけるヒト血漿由来HBeAgの%中和の頻度分布を表すグラフである。第6図は、HBsAg陽性集団で行なわれた抗HBe EIAにおける本発明による組換えDNA HBeAgの%中和の頻度分布を表すグラフである。

特許出願人 アボット・ラボラトリーズ

代理人 弁理士 青山 淳 (ほか1名)

FIG. 1

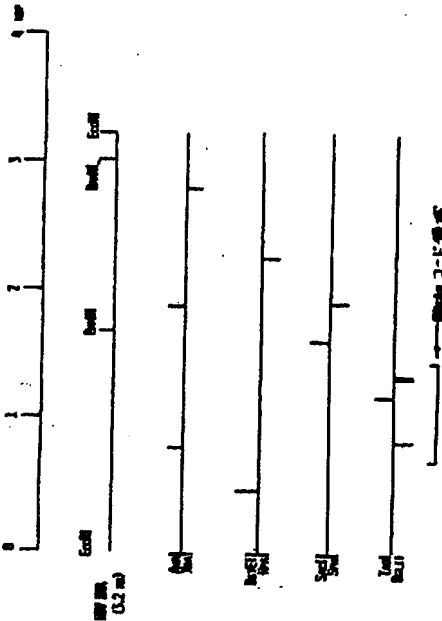


FIG. 2

100  
 110  
 120  
 130  
 140  
 150  
 160  
 170  
 180  
 190  
 200  
 210  
 220  
 230  
 240  
 250  
 260  
 270  
 280  
 290  
 300  
 310  
 320  
 330  
 340  
 350  
 360  
 370  
 380  
 390  
 400  
 410  
 420  
 430  
 440  
 450  
 460  
 470  
 480  
 490  
 500  
 510  
 520  
 530  
 540  
 550  
 560  
 570  
 580  
 590  
 600  
 610  
 620  
 630  
 640  
 650  
 660  
 670  
 680  
 690  
 700  
 710  
 720  
 730  
 740  
 750  
 760  
 770  
 780  
 790  
 800  
 810  
 820  
 830  
 840  
 850  
 860  
 870  
 880  
 890  
 900  
 910  
 920  
 930  
 940  
 950  
 960  
 970  
 980  
 990  
 1000  
 1010  
 1020  
 1030  
 1040  
 1050  
 1060  
 1070  
 1080  
 1090  
 1100  
 1110  
 1120  
 1130  
 1140  
 1150  
 1160  
 1170  
 1180  
 1190  
 1200  
 1210  
 1220  
 1230  
 1240  
 1250  
 1260  
 1270  
 1280  
 1290  
 1300  
 1310  
 1320  
 1330  
 1340  
 1350  
 1360  
 1370  
 1380  
 1390  
 1400  
 1410  
 1420  
 1430  
 1440  
 1450  
 1460  
 1470  
 1480  
 1490  
 1500  
 1510  
 1520  
 1530  
 1540  
 1550  
 1560  
 1570  
 1580  
 1590  
 1600  
 1610  
 1620  
 1630  
 1640  
 1650  
 1660  
 1670  
 1680  
 1690  
 1700  
 1710  
 1720  
 1730  
 1740  
 1750  
 1760  
 1770  
 1780  
 1790  
 1800  
 1810  
 1820  
 1830  
 1840  
 1850  
 1860  
 1870  
 1880  
 1890  
 1900  
 1910  
 1920  
 1930  
 1940  
 1950  
 1960  
 1970  
 1980  
 1990  
 2000  
 2010  
 2020  
 2030  
 2040  
 2050  
 2060  
 2070  
 2080  
 2090  
 2100  
 2110  
 2120  
 2130  
 2140  
 2150  
 2160  
 2170  
 2180  
 2190  
 2200  
 2210  
 2220  
 2230  
 2240  
 2250  
 2260  
 2270  
 2280  
 2290  
 2300  
 2310  
 2320  
 2330  
 2340  
 2350  
 2360  
 2370  
 2380  
 2390  
 2400  
 2410  
 2420  
 2430  
 2440  
 2450  
 2460  
 2470  
 2480  
 2490  
 2500  
 2510  
 2520  
 2530  
 2540  
 2550  
 2560  
 2570  
 2580  
 2590  
 2600  
 2610  
 2620  
 2630  
 2640  
 2650  
 2660  
 2670  
 2680  
 2690  
 2700  
 2710  
 2720  
 2730  
 2740  
 2750  
 2760  
 2770  
 2780  
 2790  
 2800  
 2810  
 2820  
 2830  
 2840  
 2850  
 2860  
 2870  
 2880  
 2890  
 2900  
 2910  
 2920  
 2930  
 2940  
 2950  
 2960  
 2970  
 2980  
 2990  
 3000  
 3010  
 3020  
 3030  
 3040  
 3050  
 3060  
 3070  
 3080  
 3090  
 3100  
 3110  
 3120  
 3130  
 3140  
 3150  
 3160  
 3170  
 3180  
 3190  
 3200  
 3210  
 3220  
 3230  
 3240  
 3250  
 3260  
 3270  
 3280  
 3290  
 3300  
 3310  
 3320  
 3330  
 3340  
 3350  
 3360  
 3370  
 3380  
 3390  
 3400  
 3410  
 3420  
 3430  
 3440  
 3450  
 3460  
 3470  
 3480  
 3490  
 3500  
 3510  
 3520  
 3530  
 3540  
 3550  
 3560  
 3570  
 3580  
 3590  
 3600  
 3610  
 3620  
 3630  
 3640  
 3650  
 3660  
 3670  
 3680  
 3690  
 3700  
 3710  
 3720  
 3730  
 3740  
 3750  
 3760  
 3770  
 3780  
 3790  
 3800  
 3810  
 3820  
 3830  
 3840  
 3850  
 3860  
 3870  
 3880  
 3890  
 3900  
 3910  
 3920  
 3930  
 3940  
 3950  
 3960  
 3970  
 3980  
 3990  
 4000  
 4010  
 4020  
 4030  
 4040  
 4050  
 4060  
 4070  
 4080  
 4090  
 4100  
 4110  
 4120  
 4130  
 4140  
 4150  
 4160  
 4170  
 4180  
 4190  
 4200  
 4210  
 4220  
 4230  
 4240  
 4250  
 4260  
 4270  
 4280  
 4290  
 4300  
 4310  
 4320  
 4330  
 4340  
 4350  
 4360  
 4370  
 4380  
 4390  
 4400  
 4410  
 4420  
 4430  
 4440  
 4450  
 4460  
 4470  
 4480  
 4490  
 4500  
 4510  
 4520  
 4530  
 4540  
 4550  
 4560  
 4570  
 4580  
 4590  
 4600  
 4610  
 4620  
 4630  
 4640  
 4650  
 4660  
 4670  
 4680  
 4690  
 4700  
 4710  
 4720  
 4730  
 4740  
 4750  
 4760  
 4770  
 4780  
 4790  
 4800  
 4810  
 4820  
 4830  
 4840  
 4850  
 4860  
 4870  
 4880  
 4890  
 4900  
 4910  
 4920  
 4930  
 4940  
 4950  
 4960  
 4970  
 4980  
 4990  
 5000  
 5010  
 5020  
 5030  
 5040  
 5050  
 5060  
 5070  
 5080  
 5090  
 5100  
 5110  
 5120  
 5130  
 5140  
 5150  
 5160  
 5170  
 5180  
 5190  
 5200  
 5210  
 5220  
 5230  
 5240  
 5250  
 5260  
 5270  
 5280  
 5290  
 5300  
 5310  
 5320  
 5330  
 5340  
 5350  
 5360  
 5370  
 5380  
 5390  
 5400  
 5410  
 5420  
 5430  
 5440  
 5450  
 5460  
 5470  
 5480  
 5490  
 5500  
 5510  
 5520  
 5530  
 5540  
 5550  
 5560  
 5570  
 5580  
 5590  
 5600  
 5610  
 5620  
 5630  
 5640  
 5650  
 5660  
 5670  
 5680  
 5690  
 5700  
 5710  
 5720  
 5730  
 5740  
 5750  
 5760  
 5770  
 5780  
 5790  
 5800  
 5810  
 5820  
 5830  
 5840  
 5850  
 5860  
 5870  
 5880  
 5890  
 5900  
 5910  
 5920  
 5930  
 5940  
 5950  
 5960  
 5970  
 5980  
 5990  
 6000  
 6010  
 6020  
 6030  
 6040  
 6050  
 6060  
 6070  
 6080  
 6090  
 6100  
 6110  
 6120  
 6130  
 6140  
 6150  
 6160  
 6170  
 6180  
 6190  
 6200  
 6210  
 6220  
 6230  
 6240  
 6250  
 6260  
 6270  
 6280  
 6290  
 6300  
 6310  
 6320  
 6330  
 6340  
 6350  
 6360  
 6370  
 6380  
 6390  
 6400  
 6410  
 6420  
 6430  
 6440  
 6450  
 6460  
 6470  
 6480  
 6490  
 6500  
 6510  
 6520  
 6530  
 6540  
 6550  
 6560  
 6570  
 6580  
 6590  
 6600  
 6610  
 6620  
 6630  
 6640  
 6650  
 6660  
 6670  
 6680  
 6690  
 6700  
 6710  
 6720  
 6730  
 6740  
 6750  
 6760  
 6770  
 6780  
 6790  
 6800  
 6810  
 6820  
 6830  
 6840  
 6850  
 6860  
 6870  
 6880  
 6890  
 6900  
 6910  
 6920  
 6930  
 6940  
 6950  
 6960  
 6970  
 6980  
 6990  
 7000  
 7010  
 7020  
 7030  
 7040  
 7050  
 7060  
 7070  
 7080  
 7090  
 7100  
 7110  
 7120  
 7130  
 7140  
 7150  
 7160  
 7170  
 7180  
 7190  
 7200  
 7210  
 7220  
 7230  
 7240  
 7250  
 7260  
 7270  
 7280  
 7290  
 7300  
 7310  
 7320  
 7330  
 7340  
 7350  
 7360  
 7370  
 7380  
 7390  
 7400  
 7410  
 7420  
 7430  
 7440  
 7450  
 7460  
 7470  
 7480  
 7490  
 7500  
 7510  
 7520  
 7530  
 7540  
 7550  
 7560  
 7570  
 7580  
 7590  
 7600  
 7610  
 7620  
 7630  
 7640  
 7650  
 7660  
 7670  
 7680  
 7690  
 7700  
 7710  
 7720  
 7730  
 7740  
 7750  
 7760  
 7770  
 7780  
 7790  
 7800  
 7810  
 7820  
 7830  
 7840  
 7850  
 7860  
 7870  
 7880  
 7890  
 7900  
 7910  
 7920  
 7930  
 7940  
 7950  
 7960  
 7970  
 7980  
 7990  
 8000  
 8010  
 8020  
 8030  
 8040  
 8050  
 8060  
 8070  
 8080  
 8090  
 8100  
 8110  
 8120  
 8130  
 8140  
 8150  
 8160  
 8170  
 8180  
 8190  
 8200  
 8210  
 8220  
 8230  
 8240  
 8250  
 8260  
 8270  
 8280  
 8290  
 8300  
 8310  
 8320  
 8330  
 8340  
 8350  
 8360  
 8370  
 8380  
 8390  
 8400  
 8410  
 8420  
 8430  
 8440  
 8450  
 8460  
 8470  
 8480  
 8490  
 8500  
 8510  
 8520  
 8530  
 8540  
 8550  
 8560  
 8570  
 8580  
 8590  
 8600  
 8610  
 8620  
 8630  
 8640  
 8650  
 8660  
 8670  
 8680  
 8690  
 8700  
 8710  
 8720  
 8730  
 8740  
 8750  
 8760  
 8770  
 8780  
 8790  
 8800  
 8810  
 8820  
 8830  
 8840  
 8850  
 8860  
 8870  
 8880  
 8890  
 8900  
 8910  
 8920  
 8930  
 8940  
 8950  
 8960  
 8970  
 8980  
 8990  
 9000  
 9010  
 9020  
 9030  
 9040  
 9050  
 9060  
 9070  
 9080  
 9090  
 9100  
 9110  
 9120  
 9130  
 9140  
 9150  
 9160  
 9170  
 9180  
 9190  
 9200  
 9210  
 9220  
 9230  
 9240  
 9250  
 9260  
 9270  
 9280  
 9290  
 9300  
 9310  
 9320  
 9330  
 9340  
 9350  
 9360  
 9370  
 9380  
 9390  
 9400  
 9410  
 9420  
 9430  
 9440  
 9450  
 9460  
 9470  
 9480  
 9490  
 9500  
 9510  
 9520  
 9530  
 9540  
 9550  
 9560  
 9570  
 9580  
 9590  
 9600  
 9610  
 9620  
 9630  
 9640  
 9650  
 9660  
 9670  
 9680  
 9690  
 9700  
 9710  
 9720  
 9730  
 9740  
 9750  
 9760  
 9770  
 9780  
 9790  
 9800  
 9810  
 9820  
 9830  
 9840  
 9850  
 9860  
 9870  
 9880  
 9890  
 9900  
 9910  
 9920  
 9930  
 9940  
 9950  
 9960  
 9970  
 9980  
 9990  
 10000  
 10010  
 10020  
 10030  
 10040  
 10050  
 10060  
 10070  
 10080  
 10090  
 10100  
 10110  
 10120  
 10130  
 10140  
 10150  
 10160  
 10170  
 10180  
 10190  
 10200  
 10210  
 10220  
 10230  
 10240  
 10250  
 10260  
 10270  
 10280  
 10290  
 10300  
 10310  
 10320  
 10330  
 10340  
 10350  
 10360  
 10370  
 10380  
 10390  
 10400  
 10410  
 10420  
 10430  
 10440  
 10450  
 10460  
 10470  
 10480  
 10490  
 10500  
 10510  
 10520  
 10530  
 10540  
 10550  
 10560  
 10570  
 10580  
 10590  
 10600  
 10610  
 10620  
 10630  
 10640  
 10650  
 10660  
 10670  
 10680  
 10690  
 10700  
 10710  
 10720  
 10730  
 10740  
 10750  
 10760  
 10770  
 10780  
 10790  
 10800  
 10810  
 10820  
 10830  
 10840  
 10850  
 10860  
 10870  
 10880  
 10890  
 10900  
 10910  
 10920  
 10930  
 10940  
 10950  
 10960  
 10970  
 10980  
 10990  
 11000  
 11010  
 11020  
 11030  
 11040  
 11050  
 11060  
 11070  
 11080  
 11090  
 11100  
 11110  
 11120  
 11130  
 11140  
 11150  
 11160  
 11170  
 11180  
 11190  
 11200  
 11210  
 11220  
 11230  
 11240  
 11250  
 11260  
 11270  
 11280  
 11290  
 11300  
 11310  
 11320  
 11330  
 11340  
 11350  
 11360  
 11370  
 11380  
 11390  
 11400  
 11410  
 11420  
 11430  
 11440  
 11450  
 11460  
 11470  
 11480  
 11490  
 11500  
 11510  
 11520  
 11530  
 11540  
 11550  
 11560  
 11570  
 11580  
 11590  
 11600  
 11610  
 11620  
 11630  
 11640  
 11650  
 11660  
 11670  
 11680  
 11690  
 11700  
 11710  
 11720  
 11730  
 11740  
 11750  
 11760  
 11770  
 11780  
 11790  
 11800  
 11810  
 11820  
 11830  
 11840  
 11850  
 11860  
 11870  
 11880  
 11890  
 11900  
 11910  
 11920  
 11930  
 11940  
 11950  
 11960  
 11970  
 11980  
 11990  
 12000  
 12010  
 12020  
 12030  
 12040  
 12050  
 12060  
 12070  
 12080  
 12090  
 12100  
 12110  
 12120  
 12130  
 12140  
 12150  
 12160  
 12170  
 12180  
 12190  
 12200  
 12210  
 12220  
 12230  
 12240  
 12250  
 12260  
 12270  
 12280  
 12290  
 12300  
 12310  
 12320  
 12330  
 12340  
 12350  
 12360  
 12370  
 12380  
 12390  
 12400  
 12410  
 12420  
 12430  
 12440  
 12450  
 12460  
 12470  
 12480  
 12490  
 12500  
 12510  
 12520  
 12530  
 12540  
 12550  
 12560  
 12570  
 12580  
 12590  
 12600  
 12610  
 12620  
 12630  
 12640  
 12650  
 12660  
 12670  
 12680  
 12690  
 12700  
 12710  
 12720  
 12730  
 12740  
 12750  
 12760  
 12770  
 12780  
 12790  
 12800  
 12810  
 12820  
 12830  
 12840  
 12850  
 12860  
 12870  
 12880  
 12890  
 12900  
 12910  
 12920  
 12930  
 12940  
 12950  
 12960  
 12970  
 12980  
 12990  
 13000  
 13010  
 13020  
 13030  
 13040  
 13050  
 13060  
 13070  
 13080  
 13090  
 13100  
 13110  
 13120  
 13130  
 13140  
 13150  
 13160  
 13170  
 13180  
 13190  
 13200  
 13210  
 13220  
 13230  
 13240  
 13250  
 1



FIG. 5

----- 細目θ-ゲノム配列 ----- HSV DNA 挿入開始

Thr	Met	Lie	Thr	Pro	Val	Leu	Ala	Ala	Gly	Arg	Arg	Ile	Pro	Val	Leu	Trp	Gly	Met	Asp
ACG	ATG	ATT	ACA	GCA	ATG	TTC	GCT	GCA	GCT	GCA	GCG	ATC	CGC	TGC	CTT	TGC	GCG	ATG	GAC
10																			
Ile	Asp	Pro	Tyr	Lys	Gln	Pro	Gly	Ala	Thr	Val	Gln	Leu	Ser	Pro	Leu	Pro	Ser	Arg	Asp
ATT	GAC	CGT	TAT	AAA	GAA	TTT	GAA	GCT	ACT	CTT	GAG	TTC	CTC	TGC	TTT	TTC	GCT	TGT	GAC
20																			
Pro	Pro	Pro	Ser	Val	Arg	Asp	Leu	Leu	Asp	Thr	Ala	Ser	Ala	Leu	Tyr	Arg	Gln	Ala	Leu
TTC	TTT	CGT	TGC	ATC	AAA	GAT	CTC	CTA	GAG	AGC	GCG	TGC	GCT	CTC	TAT	GCA	GAA	GCG	TTC
30																			
Gln	Ser	Pro	Gln	Gln	Gln	Ser	Pro	Gln	Gln	Thr	Ala	Leu	Arg	Gln	Ala	Ile	Leu	Gln	Trp
GAG	TGT	CGT	GAG	GAT	TGC	TGC	CGT	GAG	GAT	ACT	GCA	CTC	AGC	GAA	GCG	ATT	CTC	TGC	TGC
40																			
Gly	Gln	Leu	Met	Thr	Leu	Ala	Thr	Tyr	Val	Gly	Asn	Asn	Leu	Gln	Asp	Pro	Ala	Ser	Arg
GCG	GAA	TTC	ATG	ACT	GTA	GCT	ACC	TGC	CTC	GCG	AAT	AAT	TTC	GAA	GAT	GCA	GCA	TGT	AGC
50																			
Asp	Leu	Val	Val	Asn	Tyr	Val	Asn	Thr	Asn	Met	Gly	Leu	Lys	Ile	Arg	Gln	Leu	Leu	Trp
GAC	GTT	GTA	GTA	AAT	TAT	GTT	AAT	ACT	AGC	CTC	GCT	TTC	AAA	ATC	AGC	GAA	GTA	TTC	TGC
60																			
Pro	Gln	Ile	Ser	Gln	Leu	Thr	Pro	Gly	Arg	Gln	Thr	Val	Leu	Gln	Tyr	Leu	Val	Ser	Pro
TTT	GAT	ATA	TGT	TGC	GTT	ACT	TTT	GCA	AAA	GAT	GTA	CTT	GAA	TAT	TTC	GTC	TGT	CTC	TGC
70																			
Gly	Val	Tyr	Ile	Arg	Thr	Pro	Pro	Ala	Tyr	Arg	Pro	Pro	Asn	Ala	Pro	Ile	Leu	Ser	Thr
GGA	GTC	TGC	ATT	GCG	ACT	CGT	CGA	GCG	TAT	GAG	GCG	CGA	AAT	GCG	CGT	ATC	TTC	TGA	ACA
80																			
Leu	Pro	Gln	Thr	Thr	Val	Val	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Gly	Arg	Ser	Pro	Arg	Arg	Arg	Arg
CTT	GCG	GAA	ACT	ACT	GTT	GTT	ACT	ACT	ACT	ACT	ACT	ACT	ACT	ACT	ACT	ACT	ACT	ACT	ACT
90																			
Pro	Ser	Pro	Arg	Arg	Arg	Arg	Ser	Pro	Pro	Pro	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Ser	Gln	Ser	Arg
CTC	GTC	CTC	CGC	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA
100																			
TGT	GAA	TGT	TAG	TAT	TGC	GAC	TGA	TAA	GCT	GCG	AAA	GTT	TAG	GCG	GCT	TTC	TTC	GTC	GTC

HSV DNA 挿入開始 -----

FIG. 6

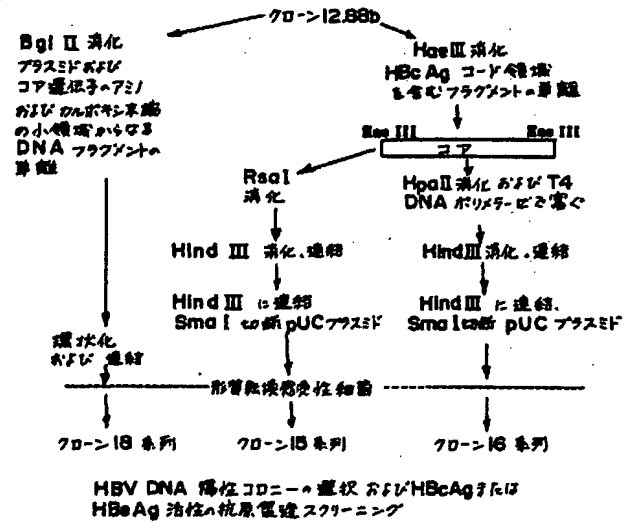


FIG. 7

サイズ (塩基対)

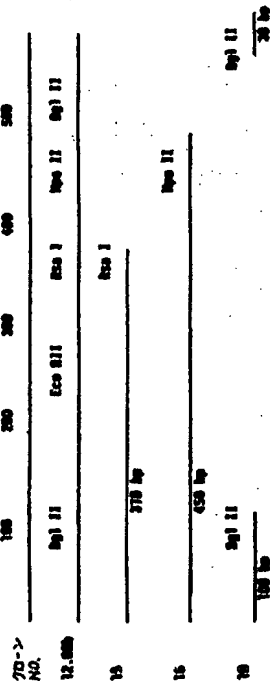


FIG. 8

----- 細目θ-ゲノム配列 ----- HSV DNA 挿入開始

Thr	Met	Lie	Thr	Pro	Val	Leu	Ala	Ala	Gly	Arg	Arg	Ile	Pro	Val	Leu	Trp	Gly	Met	Asp
ACG	ATG	ATT	ACA	GCA	ATG	TTC	GCT	GCA	GCT	GCA	GCG	ATC	CGC	TGC	CTT	TGC	GCG	ATG	GAC
10																			
Ile	Asp	Pro	Tyr	Lys	Gln	Pro	Gly	Ala	Thr	Val	Gln	Leu	Ser	Pro	Leu	Pro	Ser	Arg	Asp
ATT	GAC	CGT	TAT	AAA	GAA	TTT	GAA	GCT	ACT	CTT	GAG	TTC	CTC	TGC	TTT	TTC	GCT	TGT	GAC
20																			
Pro	Pro	Pro	Ser	Val	Arg	Asp	Leu	Leu	Asp	Thr	Ala	Ser	Ala	Leu	Tyr	Arg	Gln	Ala	Leu
TTC	TTT	CGT	TGC	ATC	AAA	GAT	CTC	CTA	GAG	AGC	GCG	TGC	GCT	CTC	TAT	GCA	GAA	GCG	TTC
30																			
Gln	Ser	Pro	Gln	Gln	Gln	Ser	Pro	Gln	Gln	Thr	Ala	Leu	Arg	Gln	Ala	Ile	Leu	Gln	Trp
GAG	TGT	CGT	GAG	GAT	TGC	TGC	CGT	GAG	GAT	ACT	GCA	CTC	AGC	GAA	GCG	ATT	CTC	TGC	TGC
40																			
Gly	Gln	Leu	Met	Thr	Leu	Ala	Thr	Tyr	Val	Gly	Asn	Asn	Leu	Gln	Asp	Pro	Ala	Ser	Arg
GCG	GAA	TTC	ATG	ACT	GTA	GCT	ACC	TGC	CTC	GCG	AAT	AAT	TTC	GAA	GAT	GCA	GCA	TGT	AGC
50																			
Asp	Leu	Val	Val	Asn	Tyr	Val	Asn	Thr	Asn	Met	Gly	Leu	Lys	Ile	Arg	Gln	Leu	Leu	Trp
GAC	GTT	GTA	GTA	AAT	TAT	GTT	AAT	ACT	AGC	CTC	GCT	TTC	AAA	ATC	AGC	GAA	GTA	TTC	TGC
60																			
Pro	Gln	Ile	Ser	Gln	Leu	Thr	Pro	Gly	Arg	Gln	Thr	Val	Leu	Gln	Tyr	Leu	Val	Ser	Pro
TTT	GAT	ATA	TGT	TGC	GTT	ACT	TTT	GCA	AAA	GAT	GTA	CTT	GAA	TAT	TTC	GTC	TGT	CTC	TGC
70																			
Gly	Val	Tyr	Ile	Arg	Thr	Pro	Pro	Ala	Tyr	Arg	Pro	Pro	Asn	Ala	Pro	Ile	Leu	Ser	Thr
GGA	GTC	TGC	ATT	GCG	ACT	CGT	CGA	GCG	TAT	GAG	GCG	CGA	AAT	GCG	CGT	ATC	TTC	TGA	ACA
80																			
Leu	Pro	Gln	Thr	Thr	Val	Val	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Gly	Arg	Ser	Pro	Arg	Arg	Arg	Arg
CTT	GCG	GAA	ACT	ACT	GTT	GTT	ACT	ACT	ACT	ACT	ACT	ACT	ACT	ACT	ACT	ACT	ACT	ACT	ACT
90																			
Pro	Ser	Pro	Arg	Arg	Arg	Arg	Ser	Pro	Pro	Pro	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Ser	Gln	Ser	Arg
CTC	GTC	CTC	CGC	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA
100																			
TGT	GAA	TGT	TAG	TAT	TGC	GAC	TGA	TAA	GCT	GCG	AAA	GTT	TAG	GCG	GCT	TTC	TTC	GTC	GTC

HSV DNA 挿入開始 -----

ベクター-DNA 系統配列 ----- 終了

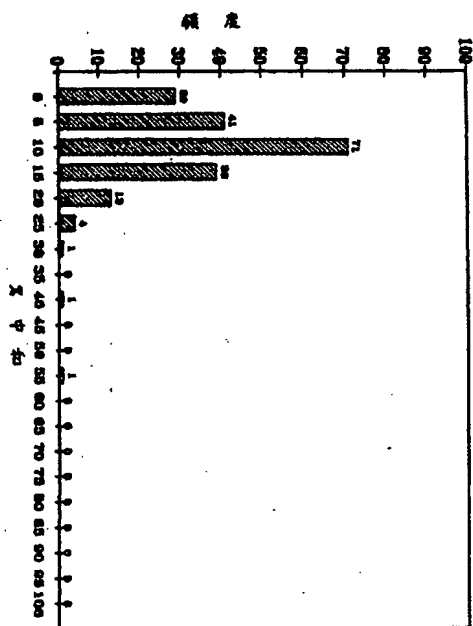


FIG. 9

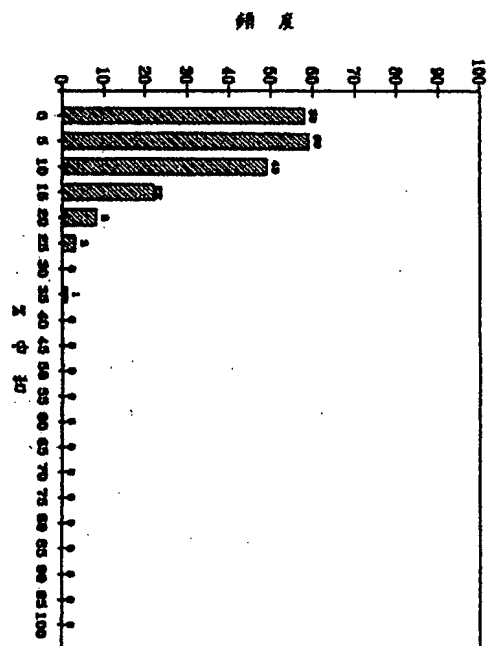


FIG. 10

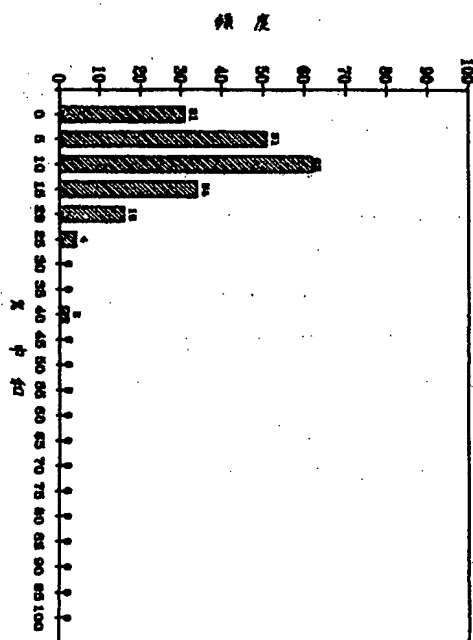


FIG. 11

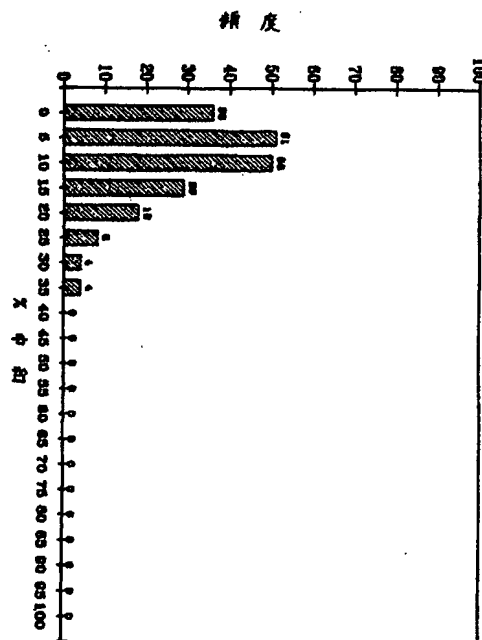


FIG. 12

FIG. 14

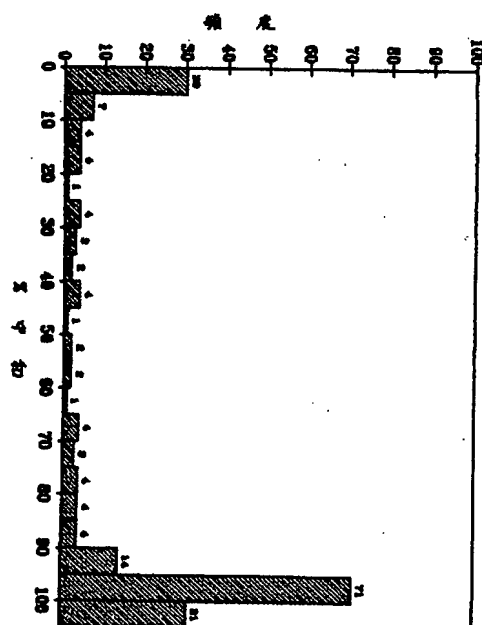


FIG. 13

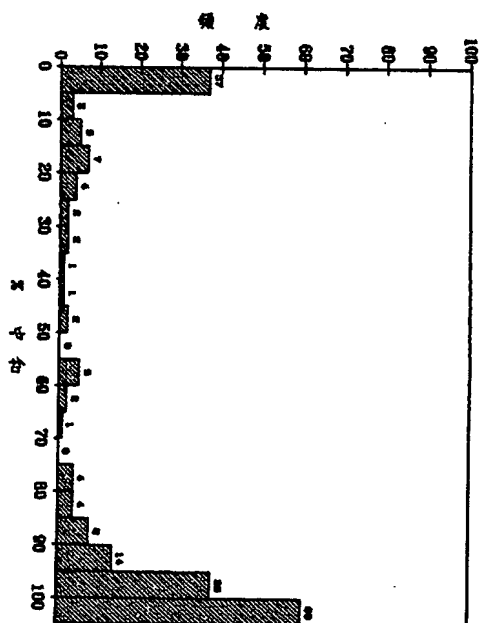


FIG. 15

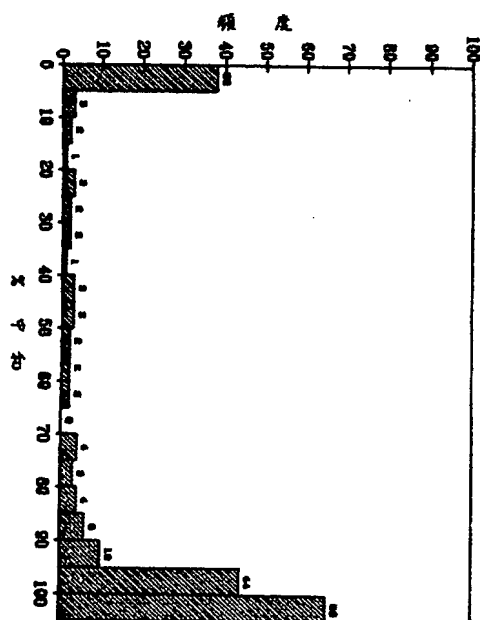
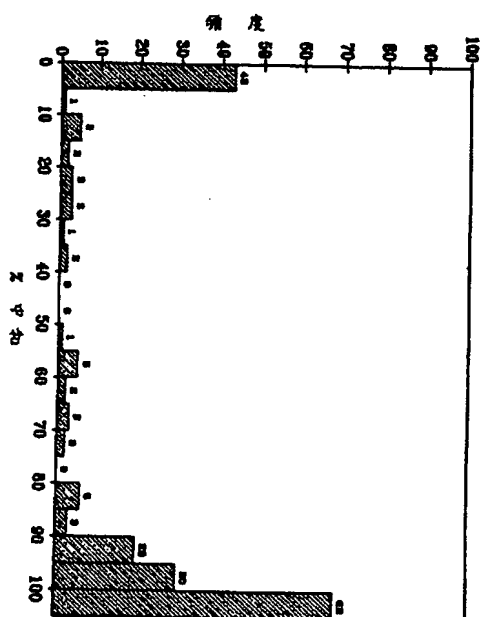


FIG. 16



第1頁の続き

⑤Int. Cl. <sup>4</sup>	識別記号	庁内整理番号
C 07 K 15/04		8318-4H
C 12 N 5/00		B-6760-4B
15/00		C-8412-4B
		A-8412-4B
C 12 P 21/00		D-6712-4B
21/02		C-6712-4B
C 12 Q 1/00		6807-4B
G 01 N 33/576		B-7906-2G
33/577		B-7906-2G
//(C 12 P 21/00		
C 12 R 1:91)		
(C 12 P 21/00		
C 12 R 1:19)		

⑦発明者 ジョナサン・エム・ス アメリカ合衆国イリノイ 60050、マツケンリー、クリー  
トラー クサイド 105番